

Aus dem Hygiene-Institut der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

(Direktor: Prof. Dr. J. Borneff)

Hygienisch-bakteriologische Untersuchungen an Tiefkühlgemüse

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Michael Wagner
aus Leipzig



r: Archiv für Hygiene und Bakteriologie, Bd 151. 1967. S. 64-90.

Dekan: Prof. Dr. L. Diethelm

Referent: Prof. Dr. J. Borneff

Tag der mündlichen Prüfung: 15. 7. 1967

I. Mitteilung: Die Beschaffenheit der Handelsware

Die Geschichte der industriellen Anwendung des Tiefgefrierens als Konservierungsmethode ist noch ziemlich jung. Die erste Tiefkühlfirma wurde im Jahre 1923 in den USA gegründet, aber die Erzeugnisse dieser neuen Industrie fanden damals und auch noch in den folgenden Jahren wenig Anklang bei den Verbrauchern. Der große Aufschwung setzte in den USA erst im zweiten Weltkrieg ein, als tiefgefrorene Lebensmittel bei der Truppenverpflegung eingeführt wurden. Auch in Deutschland bemühte man sich in dieser Zeit um das Tiefgefrieren, eine breitere Anwendung dieser Konservierungsmethode erfolgte allerdings erst gegen Ende der fünfziger Jahre. Heute erfreut sich das Tiefkühlgemüse bereits großer Beliebtheit, doch stehen wir noch erheblich hinter den USA zurück (Heineke, Borgstrom).

Die durch Erhitzung hergestellten Gemüsekonserven sind in der Regel steril oder zumindest frei von allen vegetativen Keimen. Durch Tiefgefrieren läßt sich dieses Ziel nicht erreichen. Obwohl Prudden schon 1887 darüber berichtete, wurde und wird auch heute noch vielfach angenommen, daß tiefgefrorene Gemüse keimfrei seien. Selbst in Kreisen der entsprechenden Industrien war man z. T. dieser Ansicht und vernachlässigte im Vertrauen auf den „keimabtötenden“ Effekt des Tiefgefrierens oft jegliche sanitäre Kontrolle, zumal auch keine Vorschriften und Normen bestanden (Borgstrom). Aus diesem Grunde befaßten sich schon sehr bald Wissenschaftler mit den hygienischen und bakteriologischen Problemen von Tiefkühlgemüsen (Fellers, James).

Wallace u. Tanner, Smart, Lochhead u. Jones, Pederson, Jones u. Fabian, Hobbs u. Larkin et al. stellten in umfangreichen Untersuchungen fest, daß sich in tiefgekühlten Gemüsen sehr oft eine hohe Keimzahl findet und daß sich die Keimflora aus den verschiedensten Keimarten zusammensetzt. Die hohen Keimzahlen und die nicht seltene Anwesenheit fakultativ pathogener Mikroorganismen in Tiefkühlgemüsen (z. B. Enterokokken, E. coli, Staphylokokken) lassen eigentlich erwarten, daß durch den Genuß derartiger Lebensmittel gelegentlich Erkrankungen hervorgerufen werden. Sichere Zusammenhänge zwischen dem Genuß von Tiefkühlgemüsen und einer Gastroenteritis konnten aber in keinem Falle bewiesen werden, immerhin glaubt man, daß derartige Erkrankungen vorkommen, jedoch unerkannt bleiben (Borgstrom, Elliot u. Michener).

Es ist also in Rechnung zu stellen, daß derartige kontaminierte Tiefkühlgemüse als mögliche Ursache einer Infektion zumindest nicht auszuschließen sind. Dies gilt z. B. für den Fall, daß die Gemüse nach dem Auftauen nicht gekocht, sondern nur erwärmt oder zu lange bei Zimmertemperatur gelagert werden. Hierbei würde eine rapide Vermehrung der Keime erfolgen. Nach dem Auftauen roh verzehrte Gemüse stellen ebenso eine Gefahrenquelle dar (Berry, Lochhead u. Jones, Fitzgerald, Borgstrom, Hussemann, Elliot u. Michener).

Zur Ausschaltung derartiger Gefahren wird vor allem in den USA schon seit längerer Zeit die Frage diskutiert, ob es nicht nützlich sei, standardisierte Untersuchungsmethoden für Tiefkühlgemüse, Keimzahlnormen und verbindliche Vorschriften über Herstellung, Lagerung und Transport dieser Lebensmittel einzuführen. Eine Einigung über diese Vorschläge ist jedoch noch nicht erreicht worden (American Public Health Association, Berry, Burkwall u. Hartman, Larkin et al., Splittstoesser et al., Thatcher).

Da in Deutschland diesen Problemen bisher nur sehr geringe Beachtung geschenkt wurde, hielten wir es für angezeigt, entsprechende bakteriologi-

sche Untersuchungen von Tiefkühlgemüsen aus dem Handel durchzuführen und die Keimzahlen und -arten bei der Herstellung von Tiefkühlspinat zu verfolgen, um auf diese Weise einen Überblick über den gegenwärtigen Hygiene-Stand auf dem Gefrierkostgebiet zu erhalten.

I. Material und Methoden

Zur Prüfung von Handelsware wurden insgesamt 61 Proben tiefgefrorenen Gemüses untersucht. In allen Fällen waren es industriell hergestellte und fertig verpackte Erzeugnisse, die wir im Laufe des Jahres 1964 in verschiedenen Kaufhäusern und Lebensmittelgeschäften kauften. Es handelte sich dabei um Rosenkohl, Erbsen, Dicke Bohnen, Karotten, Grünkohl und Spinat.

Die eigentliche Materialgewinnung erfolgte z. T. in Anlehnung an die von der *American Public Health Association*, von Goresline sowie von Zabrowski et al. empfohlenen Methoden:

Nach dem Kauf wurde das Untersuchungsmaterial zum Schutz gegen Auftauen in Metallfolie und Trockeneis verpackt, in das Laboratorium gebracht und dort bei -20°C bis zur Verarbeitung gelagert.

In den meisten Fällen wurden die Proben aber sofort untersucht, wobei wir beim Öffnen der Packung auf Farbe, Konsistenz und Geruch des Gemüses sowie auf die Menge der vorhandenen Eiskristalle achteten, um eventuell Hinweise auf vorheriges Auftauen und Wiedereinfrieren zu bekommen.

Bei Rosenkohl, Erbsen, Bohnen und Karotten wurde dann mit sterilen Löffeln, Messern oder Pinzetten Material von verschiedenen Stellen der Packung entnommen, dieses in einen sterilen Kolben eingewogen und soviel steriles Leitungswasser hinzugefügt, bis wir eine Verdünnung von 1:10 erhielten. Diese Mischung wurde dann mit einem Homogenisator („Ultraturrax“ der Firma Janke u. Kunkel) 2 min lang zu einem Brei homogenisiert.

Spinat und Grünkohl ließen wir zuerst bei ZT oder im Wasserbad von 37°C soweit auftauen, bis man mit einem sterilen Messer Stücke abschneiden konnte. Nach dem Abwiegen und der Zugabe von sterilem Leitungswasser erfolgte wieder die Homogenisierung. Ausgehend von der Verdünnung 1:10 stellten wir von jeder Untersuchungsprobe weitere Verd. bis 1:10 000 her, die 5 min lang auf Magnetrührern gerührt wurden.

Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl benutzten wir Schichtguß-Laktoseagar, der 48 Std. bei 37°C bebrütet wurde. Die Keimzahlen wurden von den Platten aus den geringsten, eben noch sicher auszählbaren Verdünnungen berechnet (Borneff). Zur Differenzierung der Keimarten impften wir von dieser Kultur 10 Kolonien auf Blutagar ab, von dem wir nach einer Bebrütungsdauer von 24 Std. bei 37°C die Kolonien nach ihrem Wachstum, ihrem Aussehen und durch Gramfärbung grob klassifizierten. Bei Vorhandensein von grampos. Diplokokken prüften wir serologisch auf Zugehörigkeit zur Lancefieldgruppe D bzw. N, bei hämolysierenden Staphylokokken setzten wir einen Koagulasetest an und stellten das Verhalten in Mannit und Gelatine fest.

Als Selektionsmedium für pathogene Staphylokokken benutzten wir Kochsalzagar (7,5 %; Gußplattenverfahren, 48 Std. 37°C). Zunächst wurde auch hier die Gesamtkeimzahl bestimmt, die weitere Untersuchung verlief wie vorher beschrieben.

Für den Nachweis von Enterokokken verwendeten wir Na-Azidagar mit TTC-Zusatz. Verdächtige Kolonien (dunkelrot-braunes Wachstum) wurden auf Blutagar überimpft und nach 24 Std. bei 37°C gegebenenfalls auf ihre Gruppenzugehörigkeit im Lancefield-schema untersucht.

Coliforme Keime und Fäkalcoli bestimmten wir nach Borneff mittels Schichtgußverfahren auf Hexachlorophen-Endoagar (48 Std. 37°C). Auf E. coli verdächtige Kolonien (dun-

kelrotes Wachstum mit Fuchsinglanz) überimpften wir zunächst auf Endoagar (24 Std. 37° C) und legten gegebenenfalls eine kleine „Bunte Reihe“ an (Dextrose, Laktose, Saccharose, Indol, Citrat, Bulir). Bei einem Ergebnis von Dextrose +, Laktose +, Saccharose var., Indol +, Citrat – und Bulir + sprechen wir in der Folge von *E. coli*. Zur *Colititer*-Bestimmung bebrüteten wir 1,0, 0,1, 0,01, 0,001 und 0,0001 g jeder Probe in Galle-Pepton-Laktose-Brillantgrün-Lösung. Es wurden je drei Parallelkulturen angelegt. Nach 48stündiger Bebrütung bei 37° C erfolgte von den Röhrchen mit Gasbildung eine Abimpfung auf Endoagar und die Differenzierung verdächtiger Keime durch eine „Bunte Reihe“.

Die Untersuchung auf *Salmonellen* und *Shigellen* führten wir in Anlehnung an den Vorschlag von Popp (Salmonellen-Nachweis in Fluß- und Abwasser) durch, d. h. wir gaben 30 g des Untersuchungsmaterials in 500 ml einer 6 ‰igen Kaliumtetrathionatbouillon und bebrüteten 48 Std. bei 37° C. Die Anreicherungsflüssigkeit wurde dann durch ein Membranfilter MF 50 filtriert, das in 100 ml einer 1,5 ‰igen KTT-Lösung überführt weitere 24 Std. bei 37° C verblieb. Ergab die Ausimpfung auf Phenolrotagar verdächtige Kolonien, so untersuchten wir sie serologisch. Zusätzlich erfolgte eine Direktaussaat auf Wilson-Blair- und Leifsonagar mit Bebrütungszeiten von 48 Std. bei 37° C.

II. Ergebnisse

Fast alle zur Untersuchung gekauften Gemüsepackungen waren einwandfrei und völlig dicht. Das Verpackungsmaterial bestand aus Kunststoffolien, gewachstem Papier oder einfacher bzw. innen mit einer Kunststoffolie überzogenen Pappe. Lediglich bei einer ausländischen Firma (F) waren die Produkte sehr nachlässig in einer einfachen, nicht wasserdichten Pappschachtel verpackt, bei der der Deckel so lose auf der Schachtel saß, daß er beim Transport leicht abfallen konnte. Aber selbst in diesem Falle konnten wir, wie bei allen übrigen Proben auch, weder unnatürliche Farbe noch Geruch als Zeichen eines verdorbenen Gemüses feststellen. Ebenso waren bei keiner Probe rosa Kolonien von *Torulae* nachzuweisen, die nach Meinung von Goresline als ein nahezu spezifischer Indikator für schlechte Verarbeitung und unsachgemäße Lagerung anzusehen sind.

1. Keimzahlen und Keimflora

Tabelle 1. Extremwerte der Keimzahlen.

Gemüseart	Keimzahlen/g
Rosenkohl	21 000 — 320 000
Karotten	6 500 — 47 000
Dicke Bohnen	7 000 — 280 000
Erbsen	3 000 — 58 000
Grünkohl	26 000 — 2 500 000
Spinat	3 000 — 7 600 000

Der Durchschnittswert aller untersuchten Proben besitzt keine Aussagekraft, da sich hier die z. T. sehr hohen Keimzahlen bei Grünkohl und Spinat auswirken. Läßt man daher diese beiden Gemüsesorten unberücksichtigt, so erhält man für die übrigen einen Mittelwert von nur 78 100 Keimen/g. Für Spinat errechnen sich 822 000, für Grünkohl 1 106 000 Keime/g.

Tabelle 2. Verteilung der Keimzahlen/g Gemüse.

Material	Zahl der Proben	10^4-10^5	10^3-10^4	10^5-10^6	$>10^6$
Rosenkohl	4	—	3	1	—
Karotten	2	1	1	—	—
Dicke Bohnen	4	1	1	2	—
Erbsen	4	1	3	—	—
Grünkohl	8	—	2	3	3
Spinat	39	2	12	16	9
Summe	61	5	22	22	12

Tabelle 3. Keimzahlen in Spinatproben verschiedener Hersteller.

Firma	Zahl der Proben	Gesamtkeimzahl/g				Extremwerte	
		10^3-10^4	10^4-10^5	10^5-10^6	$>10^6$	Min.	Max.
A	8	—	4	3	1	23 400	— 1 170 000
B	9	—	2	4	3	21 000	— 3 000 000
C	8	—	1	6	1	45 000	— 1 150 000
E	10	2	6	2	1	3 000	— 1 500 000
F	4	—	—	1	3	250 000	— 7 600 000
Summe	39	2	12	16	9	3 000	— 7 600 000

Tabelle 2 bestätigt, daß Grünkohl und Spinat tatsächlich höhere Keimzahlen aufweisen als die übrigen Gemüse, bei $\frac{2}{3}$ der Proben liegen die Werte im Bereich von 10^5-10^6 .

Nach der Gesamtkeimzahl im Spinat resultiert also eine Rangfolge der Hersteller: E, A, C, B, F; auch bei den übrigen Gemüsearten ergeben sich ähnliche Verhältnisse. Die Zahl der Proben ist hier jedoch zu gering, um genaue Aussagen machen zu können.

Die Keimflora bestand vorwiegend aus grampos. Diplokokken, Staphylokokken (meist Staph. albus), gramneg. Stäbchen, aeroben Erdbazillen und Sarcinen.

Im Spinat fanden wir in der Hauptsache Staphylokokken, aerobe Erdbazillen und gramneg. Stäbchen und in fast allen Proben grampos. Diplokokken. Die anderen Keimarten waren dagegen weit seltener. Bei den übrigen Gemüsen herrschten vor allem die Staphylokokken vor, sie fehlten nur in 3 der 22 Proben.

Die aus den Gesamtkeimzahlkulturen isolierten grampos. Diplokokken wurden (in Ergänzung zu den im folgenden Abschnitt beschriebenen Diplokokken-Spezialkulturen) serologisch differenziert. Wir ermittelten in 15 Spinatproben D-Streptokokken (Enterokokken) und in 5 Proben N-Streptokokken (Milchsäurekeime). Bei Grünkohl waren in einer Probe D-Streptokokken und in 2 Proben N-Streptokokken nachweisbar. Bei den übrigen Gemüsearten verlief die serologische Differenzierung ergebnislos, d. h. es handelte sich um Str.-viridans-Arten.

2. Grampositive Diplokokken, D- und N-Streptokokken

Tabelle 4. Verteilung der grampositiven Diplokokken im Gemüse (außer Spinat).

Material	Zahl der Proben	Grampositive Diplokokken/g				Extremwerte	
		0	10^1-10^3	10^3-10^5	$>10^5$	Min.	Max.
Rosenkohl	4	2	1	1	—	360 —	3 200
Karotten	2	1	1	—	—	480 —	480
D. Bohnen	4	—	4	—	—	40 —	960
Erbsen	4	—	3	1	1	100 —	1 200
Grünkohl	8	—	2	4	2	280 —	230 000
Summe	22	3	11	6	2	40 —	230 000

Die Diplokokkenzahl bei Rosenkohl, Karotten, Dicken Bohnen und Erbsen liegen also sehr niedrig; außer bei zwei Proben (3200 und 1200 Keime/g) betrug die Keimzahl weniger als 1000/g. Nur die Grünkohlproben haben teilweise höhere Diplokokkenwerte.

Tabelle 5. Zahl der grampositiven Diplokokken in Spinatproben verschiedener Firmen.

Firma	Zahl der Proben	Grampositive Diplokokken/g				Extremwerte	
		0	10^1-10^3	10^3-10^5	$>10^5$	Min.	Max.
A	8	—	—	7	1	11 000 —	160 000
B	9	1	1	5	2	380 —	236 000
C	8	—	—	8	—	1 150 —	97 000
E	10	—	2	8	—	720 —	42 500
F	4	—	—	1	3	78 000 —	550 000
Summe	39	1	3	29	6	380 —	550 000

Nur eine Spinatprobe war demnach frei von grampos. Diplokokken, die anderen enthielten erheblich mehr als die übrigen Gemüse. In der Hälfte der Grünkohl- und Spinatproben konnten durch serologische Differenzierung Enterokokken nachgewiesen werden.

3. Gesamtcoliformenzahlen und Fäkalcolitypen

Laut Tab. 6 konnten in $\frac{1}{5}$ der Spinatproben keine coliformen Keime nachgewiesen werden. Bei den übrigen Proben fanden sich bis zu 86 000 Coliforme/g, die Mehrzahl wies 10^2-10^4 /g auf.

Aus dieser Verteilung ergibt sich, daß der Befund „frei von Coliformen“ häufiger ist, als nach der Normalverteilung zu erwarten wäre, d. h. die Anwesenheit von coliformen Keimen ist kein zwangsläufiges Resultat der Fabrikation. Die Unterschiede bei den Firmen sprechen für einen Einfluß der Produktionsbedingungen. Bei $\frac{1}{3}$ der positiven Spinatproben erwiesen sich die Coliformen bei der Differenzierung als Fäkalcoli, deren Verteilung aus der Tabelle 7 ersichtlich ist.

Tabelle 6. Verteilung der Gesamtcoliformenzahlen/g in Spinatproben verschiedener Hersteller.

Firma	Zahl der Proben	Coliformenzahl/g				Extremwerte	
		0	10^1-10^3	10^3-10^5	$>10^5$	Min.	Max.
A	8	—	5	3	—	40	1 800
B	9	2	1	6	—	350	86 000
C	8	2	2	4	—	34	5 000
E	10	4	6	—	—	60	400
F	4	—	1	3	—	450	4 100
Summe	39	8	15	16	—	34	86 000

Tabelle 7. Verteilung der Zahl der Fäkalcolitypen in Spinat.

Firma	Zahl der Proben	Zahl der Fäkalcolitypen/g				Extremwerte	
		0	10^1-10^3	10^3-10^5	$>10^5$	Min.	Max.
A	8	4	4	—	—	20	510
B	9	8	—	1	—	3000	
C	8	6	2	—	—	28	400
E	10	7	3	—	—	60	240
F	4	4	—	—	—	—	
Summe	39	29	9	1	—	20	3000

Alle übrigen Gemüsesorten enthielten im Gegensatz zu Spinat keine Fäkalcolitypen.

Ein Zusammenhang zwischen hoher Gesamtkeimzahl oder Gesamtcoliformenzahl und dem Vorkommen von *E. coli* besteht nach unseren Ergebnissen nicht. Gerade die Proben mit den höchsten Gesamtkeimzahlen und den höchsten Gesamtcoliformenzahlen waren frei von Fäkalcolitypen.

Hinsichtlich der Gesamtcoliformenzahl weichen die übrigen Gemüsesorten vom Spinat im Sinne durchschnittlich niedriger Werte ab, was gleichfalls mit

Tabelle 8. Verteilung der Gesamtcoliformenzahl in Gemüse (außer Spinat).

Material	Zahl der Proben	Coliformenzahl/g				Extremwerte	
		0	10^1-10^3	10^3-10^5	$>10^5$	Min.	Max.
Rosenkohl	4	—	4	—	—	32	900
Karotten	2	1	1	—	—	12	
D. Bohnen	4	—	3	—	1*)	40	800
Erbsen	4	2	2	—	—	48	350
Grünkohl	8	—	6	2	—	170	1250
Summe	22	3	16	2	1*)	12	1250

*) = Bakterienrasen, d. h. unzählbar viele Keime.

dem Herstellungsprozeß zusammenhängt (Gemüse in Stücken mit glatter Oberfläche bzw. Spinat als Brei).

4. Colititer

Der Ausfall des Colititers geht nicht in allen Fällen dem Wachstum von coliformen Keimen auf Hexachlorophen-Endoagar parallel.

Ein pos. Titer bei neg. Plattenkultur fand sich bei 4 Spinat- und 2 Erbsenproben, das gegenteilige Verhalten ließ sich bei 4 Rosenkohl- und je einer Karotten-, Spinat- und Grünkohlprobe feststellen.

Durch Ausimpfen des Colititers auf Endoagar und nachfolgende Untersuchung der Keime in einer „Bunten Reihe“ fanden wir in je einer Probe von „Dicken Bohnen“ und Grünkohl und in 8 Spinatproben Fäkalcolitypen. Nur bei 4 Spinatproben stimmt das Auftreten mit den oben angeführten Ergebnissen (s. 4.) überein; bei den übrigen 10 Spinatproben fanden wir die Fäkalcoli entweder nur auf Hexachlorophen-Endoagar oder nur durch Ausimpfen des Colititers.

Ein gleichzeitiges Vorkommen von D-Streptokokken und Fäkalcolitypen war in 6 Spinat- und einer Grünkohlprobe zu verzeichnen. In 18 Spinat- und in 3 Grünkohlproben traten D-Streptokokken isoliert ohne Fäkalcolitypen auf.

5. Pathogene Staphylokokken, Salmonellen und Shigellen

Pathogene Staphylokokken, Salmonellen und Shigellen konnten in keiner Gemüseprobe nachgewiesen werden.

Beurteilung

Die meisten Untersucher von tiefgekühlten Gemüsen aus dem Handel haben sich in ihren Ermittlungen auf die Bestimmung der *Gesamtkeimzahlen* beschränkt. Sie kamen dabei übereinstimmend zu dem Ergebnis, daß die verschiedenen Gemüsesorten verschiedene Mittelwerte aufweisen und daß mit außerordentlich *hohen Standardabweichungen* gerechnet werden muß. Unsere Analysen haben dies voll bestätigt. *Lochhead* u. *Jones* und *Smart* führen diese Differenzen auf verschiedene Ursachen zurück: Geographische, jahreszeitliche und klimatische Faktoren, unterschiedliche Herstellung, Verpackung, Lagerung und Versand. Es nimmt deshalb nicht wunder, daß jeder Untersucher seine eigenen Vorstellungen über die *Keimzahlnorm* entwickelte. *Hobbs* gab z. B. die Gesamtkeimzahl für „normale“ tiefgefrorene Lebensmittel mit 10 000/g oder niedriger an (dieser Wert bezieht sich allerdings nicht nur auf Gemüse), die American Public Health Association fand in frisch eingefrorenem Gemüse mit wenigen Ausnahmen 500 000 Keime/g, *Larkin* et al. rechnete bei Bohnen 3000–1 000 000, bei Spinat 3000 (2 Proben!), bei Lima-Bohnen 23 000–35 000 und bei Mais 800 000 Keime/g als „normal“. Diese Werte liegen im ganzen gesehen erheblich unter unseren Ergebnissen; sie sind mit ihnen im übrigen nur unter gewissen Vorbehalten zu vergleichen, da es sich, abgesehen von Spinat und

Bohnen, um Gemüsearten handelte, die in Deutschland nicht verkauft werden. Außerdem erlauben 2 Spinatproben (wie bei *Larkin*) keine verbindliche Aussage über die „normale“ Keimzahl dieses Gemüses. Wir fanden zwar auch eine Spinatprobe mit nur 3000 Keimen/g, im allgemeinen lagen aber die Werte entschieden höher, so daß wir den von *Larkin* et al. für Spinat angegebenen Wert für einen Zufallsbefund halten. Auch die Angaben von *Smart* (1934), die wegen der großen Zahl der untersuchten Proben (mehr als 3000) als zuverlässig gelten dürfen, sprechen im gleichen Sinne (Bohnen 50–7000, Erbsen 7000–1 000 000, Spinat 57 000–1 000 000).

Auffallenderweise fanden weder wir noch andere Untersucher bisher eine Gemüseprobe, die selbst nach längerer Lagerungszeit *vollständig keimfrei* war. *Hucker* et al. glaubten dies auf eine kälteresistente Grundflora („base“-freeze resistant flora) zurückführen zu können, die nur in indirektem Zusammenhang mit der Gesamtkeimzahl vor dem Einfrieren stehe.

Für die hygienische Beurteilung gilt es nun zu entscheiden, welche Bedeutung man den Gesamtkeimzahlen beimessen kann, vor allem aber, *ob man aus der Höhe der Keimwerte auf die Qualität des Gemüses schließen darf*. In diesem Falle könnte man z. B. mit Hilfe eines Gesamtkeimzahlstandards einfach und schnell qualitativ minderwertige von einwandfreien Produkten trennen und somit den Verbraucher vor eventuellen Gefahren schützen. Darüber wird seit langem, wie eingangs erwähnt, besonders in den USA, diskutiert, ohne daß man sich bisher auf eine verbindliche Normzahl einigen konnte, was bei der unterschiedlichen Höhe der Keimzahlen auch nicht verwunderlich ist (*Tressler, Hucker* et al., *Elliot* u. *Michener*). Die Erfahrungen in den USA haben gezeigt, daß es möglich ist, zumindest *tiefgefrorene Erbsen* mit einer Gesamtkeimzahl von 100 000/g zu produzieren (*Borgstrom*). Unsere Untersuchungen haben dies bestätigt. Der Behauptung *Borgstroms*, es sei unmöglich, *Spinat* mit diesen niedrigen Keimzahlen herzustellen, können wir allerdings auf Grund unserer Ergebnisse nicht beistimmen. Immerhin hatte ca. $\frac{1}{3}$ der von uns untersuchten Spinatproben Gesamtkeimzahlen von unter 100 000/g. Auch die oben angeführten Ergebnisse von *Larkin* et al. sowie von *Smart* widerlegen diese Ansicht, d. h. ein Standard von 100 000 Keimen/g erschiene danach für Spinat gleichermaßen gerechtfertigt.

Beurteilen wir nun die von uns gefundenen Gesamtkeimzahlen mit diesem Standardwert, so wären 33 der 61 Gemüseproben (bei Spinat 25 von 39) zu beanstanden, d. h. mehr als die Hälfte aller Gemüseproben dürfte also „wegen mangelhafter Qualität und Verdorbenseins“ nicht zum Verbrauch zugelassen werden. Gegen eine solche schematische Bewertung wandten sich aber bereits *Pederson; Hucker* et al.; *Humphrey; Hucker* sowie *Slanetz* et al. und auch wir sind der Ansicht, daß Rückschlüsse aus der Gesamtkeimzahl auf die Qualität nicht erlaubt sind, da man bei der „Gesamtkeimzahl“ nur einen Teil aller vorhandenen Keime bestimmt und außerdem die Pathogenität nicht bewertet. *Eine niedrige Gesamtkeimzahl gewährleistet also keinesfalls ein Produkt, das frei von Krankheitserregern und somit auch qualitativ einwandfrei ist!* Mit Hilfe eines Gesamtkeimzahlstandards ist daher ein

Schutz des Verbrauchers vor gesundheitsgefährdenden Produkten nicht zu erreichen.

Die Bestrebungen, Keimzahl-Grenzwerte einzuführen, werden häufig mit dem Hinweis auf die Wasserhygiene begründet. Dabei ist aber zu beachten, daß sich in jedem Hygiene-Lehrbuch der Hinweis findet, der Richtwert von 100 Keimen/ml könne bedenkenlos überschritten werden, wenn die örtlichen Bedingungen dies rechtfertigen. Es wird zudem meist vergessen, daß eine Überschreitung keine rechtlichen Folgen nach sich zieht! Gerade das ist aber das Ziel der Befürworter des Keimzahlstandards bei Lebensmitteln, nämlich *gesetzliche Verankerung und strafrechtliche Verfolgung der Grenzzahlüberschreitungen*. Auf die Fragwürdigkeit dieser Denkweise haben Knorr sowie Borneff bei der Speiseeisbeurteilung deutlich hingewiesen. Die gleichen Argumente können für Tiefkühlgemüse angeführt werden.

Auf der anderen Seite bedeutet diese Einstellung keinesfalls ein grundsätzliches Tolerieren jeglicher Keimwerte. *Wir betrachten die Gesamtkeimzahlbestimmung als ein wertvolles Hilfsmittel zur Beurteilung der Betriebshygiene*. Keimzahlen von über 100 000/g sollten hier in jedem Falle Kontrollmaßnahmen und Überprüfungen des Produktionsganges auslösen. Wünschenswert wäre die Auflage für alle einschlägigen Betriebe, regelmäßige Analysen dieser Art auszuführen.

In diesem Zusammenhang ist auch das „Coli-Problem“ zu berücksichtigen. Mitteilungen über die *Gesamtcoliformenzahlen* in Tiefkühlgemüsen und ihre Bewertung finden sich in der Literatur nur spärlich; vor allem wird, hauptsächlich von amerikanischen Autoren, nicht immer eine strenge Trennung zwischen Coliformen und Fäkalcoli gemacht. Häufig wird „coliformer Keim“ sogar als gleichbedeutend mit Fäkalcoli und mit fäkaler Verunreinigung gebraucht (Elrod), eine nach unserer Ansicht untragbare Schlußfolgerung.

Larkin et al. gaben die Coliformenbelastung von Tiefkühlgemüsen mit 20–790/g an, ein Wert, der mit unseren Resultaten konform geht. Es ist aber zu beachten, daß auch weit höhere Werte keine Aussage über fäkale Verunreinigung und Gesundheitsgefährdung erlauben. Eine hohe Coliformenzahl gestattet lediglich, ebenso wie eine hohe Gesamtkeimzahl, den Verdacht auf nachlässige Betriebsführung und allgemeine Unsauberkeit während des Herstellungsprozesses.

Im Gegensatz zu den Coliformen wird die Rolle des *E. coli Typ I* als Leitkeim fäkaler Verunreinigung nicht bezweifelt. Auch wir werten grundsätzlich das Vorkommen dieser Keime als Hinweis auf eine Infektionsmöglichkeit mit pathogenen Darmkeimen. Allerdings ist es nicht erlaubt, von der Zahl der Colikeime im Fertigprodukt auf das Ausmaß einer Fäkalverschmutzung zu schließen. Starre Zahlennormen als Maßstab von fäkalen Verunreinigungen sind deshalb auch bei Gefriergemüsen nicht zu empfehlen.

Würde man jedoch unabhängig von der Zahl das Vorkommen von *E. coli* beanstanden, so hätte ein Viertel aller von uns untersuchten Gemüseproben, bei Spinat sogar ein Drittel vom Verkauf ausgeschlossen werden müssen. Diese Zahlen erhöhen sich noch, wenn man auch die Enterokokken als Fäkal-

indikatoren ansieht, denn dann wären 32 der 39 Spinatproben verunreinigt gewesen. In Anbetracht der Tatsache, daß noch von keinem Autor Salmonellen gefunden wurden, wäre die Beanstandung jedoch eine fragwürdige Entscheidung. Wir bezweifeln daher im Falle der Tiefkühlgemüse die Zulässigkeit der Schlußfolgerung: *E. coli* = Infektionsgefahr. Trotzdem empfehlen wir, für die Praxis der Überwachung von Handelsware neben der Gesamtkeimzahl auch Coliforme und Enterokokken zu ermitteln. Da keine statistischen Zusammenhänge zwischen diesen verschiedenen Kriterien gefunden wurden, erhält man mit der Ausdehnung der Diagnostik eine erhebliche Verbesserung in der Sicherheit des Urteils.

Wir schlagen vor, eine Betriebskontrolle vorzunehmen, wenn mehr als 1000 Coliforme bzw. Diplokokken/g festgestellt werden. Lediglich bei den Gefriergemüsen von breiiger Konsistenz wird man die Diplokokkengrenze bei 10 000/g ziehen.

Zusammenfassung

Es wurden 61 Proben tiefgekühlten Gemüses bakteriologisch untersucht. Die Keimzahlen variierten sehr stark, Grünkohl und Spinat wiesen die höchsten Durchschnittswerte auf (1 100 000 bzw. 820 000 Keime/g), die übrigen Gemüse lagen bei 78 000 Keimen/g. *D-Streptokokken* ließen sich in 24 der 39 Spinat- und 4 der 8 Grünkohlproben nachweisen; die anderen Gemüse waren frei von diesen Keimarten. Die Gesamtcoliformenzahlen reichten bei Spinat bis 86 000/g, bei den übrigen Gemüsen lagen sie unter 1000/g. Bei 14 der Spinatproben fanden sich auch *Fäkalcolitypen*.

Pathogene *Staphylokokken*, *Salmonellen* und *Shigellen* konnten in keiner Gemüseprobe nachgewiesen werden.

Die hygienischen Schlußfolgerungen werden diskutiert, wobei festgestellt wird, daß ein rechtlich wirksamer Keimzahlstandard nicht vertretbar ist. Erhöhte Keimwerte sollten allerdings Anlaß zu Betriebskontrollen sein.

Summary

61 samples of deep-frozen vegetables were examined bacteriologically. The germ numbers were found to vary rather strongly. Colewort and spinach had the highest average values (1,100,000 and 820,000 germs/g respectively), the germ numbers of the other vegetables amounted to about 78,000 germs/g. *D-streptococci* could be detected in 24 of the 39 spinach samples and in 4 of the 8 colewort samples. The other vegetables were free from these germ species. The total number of coliforms amounted to 86,000/g with spinach, while they were lower than 1,000/g with the other vegetables. Fecal coli types were found in 14 spinach samples.

Pathogenic staphylococci, salmonellae and shigellae could not be detected in these vegetable samples.

The hygienic conclusions are discussed. The authors point out that legally valid standards to govern permissible germ numbers are not warranted. However, increased germ numbers should prompt plant inspections.

Résumé

61 échantillons de légumes congelés ont été soumis à une analyse bactériologique. Le nombre des germes a varié dans de fortes proportions; la valeur moyenne a été plus élevée pour le chou vert et l'épinard (1.100.000 et 820.000 germes/g) tandis que pour les autres légumes, elle était de 78.000 germes/g environ. Les streptocoques *D* ont pu être trouvés dans 24 échantillons sur 39 pour l'épinard et dans 4 sur 8 pour le chou vert; les autres légumes ne possédaient pas ce genre de germes. Le nombre total des coli-

formas a atteint 86.000/g pour l'épinard et n'a pas dépassé 1.000/g pour les autres légumes. On a également trouvé chez 14 échantillons d'épinard des types de colibacilles fécaux.

Les staphylocoques pathogènes, les salmonellae et les bacilles de Shiga n'ont pu être mis en évidence dans aucun échantillon de légume.

Les conclusions à tirer sur le plan hygiénique sont ensuite discutées; il en ressort qu'il n'est pas possible de fixer un nombre de germes standard sur le plan juridique. Des valeurs élevées de germes doivent cependant automatiquement inciter à entreprendre des contrôles de fabrication.

Resumen

Se realizaron exámenes bacteriológicos en 61 pruebas de legumbres congeladas. Los números de gérmenes variaron de una manera notable; en la col y la espinaca se comprobaron los mayores valores de promedio (1.100.000 y 820.000 gérmenes/g respectivamente), mientras que en los demás vegetales se comprobaron valores de alrededor de 78.000 gérmenes/g. Se descubrieron *estreptococos-D* en 24 de las 39 pruebas de espinaca y en 4 de las 8 pruebas de col; en las otras verduras no se observaron estas especies de gérmenes. Los números totales de las formas de *coli* llegaron en espinaca a 86.000 gérmenes/g, y en las otras legumbres no alcanzaron los 1000/g. En 14 de las pruebas de espinaca se encontraron también tipos de *colibacilos fecales*.

Estafilacocos patógenos, salmonelas y shigellas no se descubrieron en ninguna de las pruebas de verduras.

Se discute sobre las conclusiones higiénicas, señalándose a este respecto que no se puede fijar un standard del número de gérmenes por determinación legal. No obstante, un incremento de los números de gérmenes debería ser sometido a controles de fabricación.

Schrifttum

- American Public Health Association; Amer. J. publ. Hlth. 36 (1946), 332.
 Berry, J. A.: Ice and Refrig. 84 (1933), 204, zit. n. H. F. Smart: Food Res. 2 (1937), 515.
 Berry, J. A.: Canner 78 (1934), 13.
 Berry, J. A.: J. Bact. 51 (1946), 639.
 Borgstrom, G.: Advanc. Food Res. 6 (1955), 163.
 Borneff, J.: Arch. Hyg. 136 (1952), 5.
 Borneff, J.: Arch. Hyg. 136 (1952), 97.
 Borneff, J.: Arch. Hyg. 141 (1957), 505.
 Burkwall, M. K. u. P. A. Hartman: Appl. Microbiol. 12 (1964), 18.
 Elliot, R. P. u. H. D. Michener: Appl. Microbiol. 9 (1961), 452.
 Elrod, R. P.: J. Bact. 44 (1942), 433.
 Fellers, C. R.: Amer. J. publ. Hlth. 22 (1932), 601.
 Fitzgerald, G. A.: Amer. J. publ. Hlth. 37 (1947), 695.
 Goresline, H. E.: J. Ass. Offic. Agr. Chemists 31 (1948), 519, zit. n. G. Borgstrom: Advanc. Food Res. 6 (1955), 163.
 Heineke, H.: Kieler Studien, Forschungsber. des Inst. f. Weltwirtschaft an der Univ. Kiel, 1958 (49).
 Hobbs, B. C.: Intern. Congr. Microbiol., 6th Congr. (Rome) 3 (1953), 288, zit. n. R. P. Elliot u. H. D. Michener: Appl. Microbiol. 9 (1961), 452.
 Hucker, G. J., R. F. Brooks, A. J. Emery: Food Technol. 6 (1952), 147.
 Hucker, G. J. u. W. B. Robinson: Canner 111 (1950), 16.
 Hucker, G. J.: Food Technol. 8 (1954), 79.
 Humphrey, H. J.: Canner 111 (1950), 10.
 Husseman, L. D.: J. Amer. diet. Ass. 31 (1955), 253.
 James, L. H.: Fruit Products J. 12 (1932), 110, zit. n. G. Borgstrom: Advanc. Food Res. 6 (1955), 163.
 Jones, A. A. u. F. W. Fabian: Techn. Bulletin 229, Agr. Exptl. Station, Michigan State University, 1952.
 Knorr, M.: Arch. Hyg. 136 (1952), 226.
 Larkin, E. P., W. Litsky, J. E. Fuller: Appl. Microbiol. 3 (1955), 98.
 Lochhead, A. G. u. A. H. Jones: Food Res. 1 (1936), 29; 3 (1938), 299; 4 (1939), 203.
 Pederson, C. S.: Food Res. 12 (1947), 429.
 Popp, N.: Zbl. Bact. I. Abt. Orig. 189 (1963), 366.
 Prudden, T. E.: Med. Record 31 (1887), 341, 369; zit. n. G. Borgstrom: Advanc. Food Res. 6 (1955), 163.
 Slanetz, L. W.: Mikrobiological quality of foods, New York-London 1963.
 Smart, H. F.: Phytopathology 24 (1934), 1319.
 Smart, H. F.: Food Res. 2 (1937), 515; 4 (1939), 293.
 Splitstoeser, D. F., R. Wright, G. J. Hucker: Appl. Microbiol. 9 (1961), 303.
 Splitstoeser, D. F., G. E. R. Hervey II, W. P. Wettergreen: J. Milk Food Technol. 28 (1965), 149.
 Thatcher, F. S.: Food Technol. 12 (1958), 117.
 Thatcher, F. S.: J. Appl. Bact. 26 (1963), 266.
 Tressler, D. K.: Refrig. Eng. 36 (1938), 319, zit. n. G. Borgstrom: Advanc. Food Res. 6 (1955), 163.
 Wallace, G. J. u. F. W. Tanner: Fruit Prod. J. 13 (1933), 52, zit. n. H. F. Smart: Food Res. 2 (1937), 515.
 Wallace, G. J. u. F. W. Tanner: Fruit Prod. J. 14 (1935), 235, zit. n. G. Borgstrom: Advanc. Food Res. 6 (1955), 163.
 Zaborowsky, H., D. A. Huber u. M. M. Rayman: Appl. Microbiol. 6 (1958), 97.

II. Mitteilung: Ergebnis einer Betriebskontrolle

Mit 2 Abbildungen

Die Herkunft der Mikroorganismen des Tiefkühlgemüses wurde durch die Untersuchungen von *Splitstoesser et al.*, *Slanetz et al.*, *Smart u. Brunstetter*, *Vaughn u. Stadtman*, *Pederson*, *Hucker u. Robinson*, *Hucker et al.*, *Engley* sowie *Thatcher* geklärt; insbesondere geben die Autoren Hinweise über die Abhängigkeit der Keimzahl von der Fertigung, dem sanitären Zustand des Betriebes, der Dauer des Produktionsvorganges sowie der Lagerung. Da sich die Angaben aber ausschließlich auf ausländische Produktionen beziehen, hielten wir es für angezeigt, diese Ergebnisse durch eigene Analysen zu ergänzen, um auch den derzeitigen Standard in Deutschland zu dokumentieren. Zwar werden teilweise schon von deutschen Betrieben, wenn auch nur in begrenztem Umfang, bakteriologische Untersuchungen in eigener Regie durchgeführt, doch würden die Resultate — falls man sie zur Auswertung freigäbe — zu einem fundierten Urteil nicht ausreichen. Es bedarf vor allem einer sorgfältigen Differenzierung der Keimarten.

Zum Verständnis der nachfolgenden Angaben sei zunächst eine kurze Beschreibung des Herstellungsprozesses von Tiefkühlspinat vorausgeschickt:

Der Freilandspinat wird unmittelbar nach der Ernte ohne weitere Vorbehandlung auf Lastwagen in die Fabrik geliefert, dort sofort der Verarbeitung zugeführt oder, falls die angelieferte Menge zu groß ist, in größeren Haufen gelagert. Die Zeit zwischen Ernte und Verarbeitungsbeginn beträgt nach Angaben der Firma höchstens 4–6 Stunden. Die Aufarbeitung des Spinates vom Frischgemüse bis zum fertig verpackten und tiefgefrorenen Endprodukt erfolgt vollmaschinell. Dabei wird der rohe Spinat zunächst auf einem offenen Förderband in eine ca. 10 m lange Trommelwaschanlage transportiert und hier durch eine große Spindel weiterbewegt. Von der Decke dieser Waschanlage spritzt aus zahlreichen Düsen Leitungswasser auf das Gemüse; das Wasser und der abgespülte Schmutz sammeln sich am Boden der Trommel und fließen von dort in die Kanalisation ab. Das gewaschene Gemüse gelangt nun auf einem offenen Förderband in den sog. Blanchierapparat, wo es ca. 3–5 min auf 85° C erhitzt wird. Über eine kurze Rohrverbindung kommt es in ein Passiergerät und wird hier zu einem dickflüssigen Brei zermahlen, der einen Wassergegenstromkühler durchläuft und sich in einem großen, oben nur lose mit einer Kunststoffplatte bedeckten Silo sammelt. Dieser Stau ist durch die langsamere Durchlaufgeschwindigkeit in dem nun folgenden zweiten Kühler bedingt, er hängt aber außerdem auch von der späteren Packgeschwindigkeit ab. Nach der Passage des zweiten Gegenstromkühlers gelangt der Gemüsebrei über eine zusammengesetzte Rohrleitung in die Packmaschine, wo er durch Düsen in sterile Kunststoffbeutel gespritzt wird, die die Maschine automatisch verklebt.

Die Gesamtdurchlaufzeit wird von der Firma mit 1 bis 2 Stunden angegeben, was aber wohl nur für den Teil des Spinates zutrifft, der sozusagen immer „im Hauptstrom schwimmt“. Die anderen Teile des Spinates befinden sich in dem Silo oder werden in

den zahlreichen toten Winkeln und Ecken des Rohrsystems nur sehr langsam weitertransportiert. Für diesen Teil des Spinates kann die Durchlaufzeit nicht einmal geschätzt werden.

Der abgepackte Spinat wird 2½ Stunden bei -25°C eingefroren und danach bis zum Versand in Tiefkühlagerräumen bei -20°C gelagert. Die Säuberung und Desinfektion der Anlage erfolgt durch Druckspülung mit Wasser bzw. einer 1 %igen Tego-Lösung.

Das Untersuchungsmaterial für die Stufenkontrolle wurde an folgenden Stellen des Produktionsganges entnommen:

1. Rohmaterial (15°C),
2. nach der Waschanlage (12°C Wassertemperatur),
3. nach dem Blanchieren (80°C),
4. nach dem Passieren (70°C),
5. aus dem Silo nach dem ersten Kühler (17°C),
6. nach dem zweiten Kühler (10°C),
7. nach dem Verpacken (12°C),
8. nach dem Einfrostern (-25°C).

Zur Entnahme benutzten wir sterile Pinzetten und sterile Löffel oder ließen den Gemüsebrei durch einen Hahn direkt in sterile Bechergläser laufen (Stellen 4 und 6). Die Proben wurden noch in der Fabrik verarbeitet, wobei wir von jeder Entnahmestelle drei Parallelteste ansetzten.

Hierzu wurden das Rohmaterial, der gewaschene und der blanchierte Spinat in sterilen „Starmix“-Apparaten zu einem Brei zermahlen und das eingefrorene Material im Wasserbad von 37°C soweit aufgetaut, daß man mit einem sterilen Messer Stücke abschneiden konnte. Bei den übrigen Proben erlaubte die breiige Konsistenz eine sofortige Verarbeitung.

Das Untersuchungsmaterial wurde dann in sterile Kolben eingewogen und durch Zugabe einer entsprechenden Menge sterilen Leitungswassers auf 1:10 verdünnt und homogenisiert.

Der bakteriologische Untersuchungsgang entsprach dem in der Mitteilung I angegebenen Verfahren.

Ergebnisse

Keimzahlen und Keimflora

Die Abb. 1 zeigt das Verhalten der Keimzahlen, die an den einzelnen Entnahmestellen gefunden wurden. Die angegebenen Werte stellen das arithmetische Mittel aus je drei Parallelproben dar. Um zu prüfen, ob sich diese Mittelwerte der einzelnen Entnahmestellen statistisch unterscheiden, wurde eine „Einfache Varianzanalyse“ durchgeführt. Diese ergab für die Mittelwerte der einzelnen Entnahmestellen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P\ 0,001$ eine signifikante Differenz.

Die Keimzahl von 300 000 pro Gramm Rohgemüse (Entnahmestelle 1) sinkt also durch das Waschen auf die Hälfte ab, wobei anzunehmen ist, daß der Waschprozeß hauptsächlich diejenigen Keime beseitigt, die sich in dem den Blättern anhaftenden Schmutz und Tauwasser befinden. Die unmittelbar auf der Oberfläche und in den Spalten der Blätter sitzenden Bakterien dürften kaum entfernt werden.

An der 2. und 3. bzw. 4. Stelle folgt ein weiterer Keimzahlabfall, der hauptsächlich durch den Blanchierprozeß und die hohen Temperaturen im

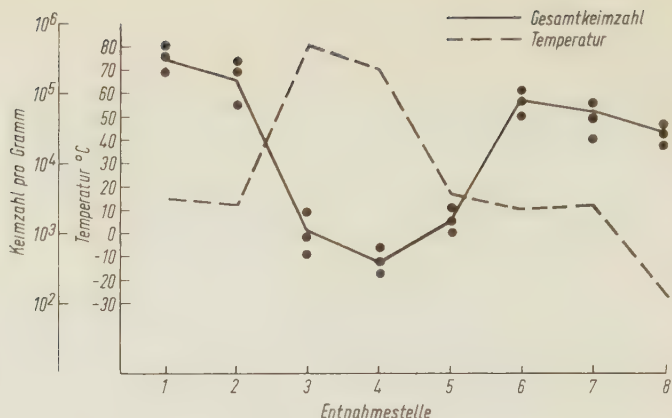


Abbildung 1. Keimzahlen an den einzelnen Entnahmestellen.

Passierapparat bedingt ist. Zu beachten ist allerdings, daß im Gemüse trotz der thermischen Behandlung noch Keime nachweisbar sind, wenn auch im Verhältnis zum Ausgangswert in sehr geringer Zahl.

An der 5. Stelle beginnt ein leichter Wiederanstieg der Keimzahl, jedoch beträgt der Wert von 1400 Keimen/g nur ca. 0,5 % des Ausgangswertes. Erst beim Übergang zur 6. Stelle erfolgt eine sprunghafte Zunahme auf 75 000 Keime/g (= 25 %), was bereits dem Endwert nahekommt. Dieser Keimzahlanstieg verläuft parallel dem Temperaturabfall von 80° bzw. 70° C auf 12° C. Ob diese Keimzahlvermehrung durch die für das Bakterienwachstum günstigeren Temperaturverhältnisse (40°–20° C) bedingt ist oder auf exogener Zufuhr neuer Keime beruht, wird im folgenden noch besprochen.

Das Einfrieren bewirkt keineswegs die gleiche Keimzahlreduktion wie das Blanchieren, d. h. ein Kälteschock erzeugt keine Vernichtung aller Keime. Die Keimzahl sinkt zwar von 50 000 auf 25 000 Keime/g, sie liegt aber damit noch wesentlich höher als nach dem Blanchieren.

Die Keimflora setzt sich in fast allen Proben aus grampos. Diplokokken, aeroben Erdbazillen, gramneg. Stäbchen und Staph. albus zusammen. Die Aufgliederung von 29 untersuchten Kolonien pro Entnahmestelle ergibt folgendes Bild (Tab. 1).

Nach Tab. 1 besteht die Bakterienflora des Rohgemüses zu rund $\frac{2}{3}$ aus grampos. Diplokokken und aeroben Erdbazillen, beide wiederum stehen in

Tabelle 1. Zusammensetzung der Keimflora an den einzelnen Entnahmestellen.

Entnahmestelle	1	2	3	4	5	6	7	8
grampositive Diplokokken	11	2	4	10	19*)	20*)	16*)	28
Sporenbildner	11	3	18	16	10	1	1	1
gramnegative Stäbchen	5	10	—	—	—	8	12	—
Staphylokokken	2	14	7	3	—	—	—	—
Summe	29	29	29	29	29	29	29	29

*) Bei diesen Diplokokken handelt es sich z. T. um D-Streptokokken.

einem Verhältnis von 1:1. Bei dem restlichen Drittel handelt es sich um gramneg. Stäbchen und Staph. albus im Verhältnis von ca. 2:1.

Nach dem *Waschprozeß* bilden gramneg. Stäbchen und Staphylokokken (2:3) zusammen $\frac{5}{6}$ der Gesamtflora, während Diplokokken und Sporenbildner (1:1) das restliche Sechstel ausmachen. Die Verminderung des Anteils dieser beiden Keimarten beruht wohl darauf, daß sie durch das Waschen mit dem den Blättern anhaftenden Schmutz und Tauwasser abgespült wurden.

Durch die Hitzeeinwirkung an den *Stellen 3 und 4* scheinen die gramneg. Stäbchen vernichtet zu werden. Die Keimflora besteht dort nur noch aus Sporenbildnern, Diplokokken und Staphylokokken. Dabei machen die Sporenbildner, wie auf Grund ihrer Hitzeresistenz zu erwarten war, die Hälfte der Gesamtflora aus, aber auch der Anteil der Diplokokken ist wieder ein wenig angestiegen, wogegen sich der der Staphylokokken stark verminderte.

Bei der folgenden *Stelle 5* sind dann die Staphylokokken völlig verschwunden, während die Diplokokken zunehmen. Dabei handelt es sich jedoch nicht nur wie in allen vorhergehenden Proben um Viridans-Streptokokken, sondern es treten jetzt auch D-Streptokokken auf. Die Diplokokken dieser Probe können also nicht nur aus Überlebenden der ursprünglichen Flora bestehen, sondern diese neuen D-Streptokokken müssen frisch in so großer Zahl in den Gemüsebrei gelangt sein, daß sie die Sporenbildner in der Gesamtflora anteilmäßig stark zurückdrängen.

An der *6. und 7. Entnahmestelle* bleibt der Anteil der D-Streptokokken ziemlich unverändert. Die Sporenbildner treten weiter zurück, neu bzw. erneut erscheinen gramnegative Stäbchen.

Nach dem *Einfrieren* dominieren weiterhin die grampos. Diplokokken.

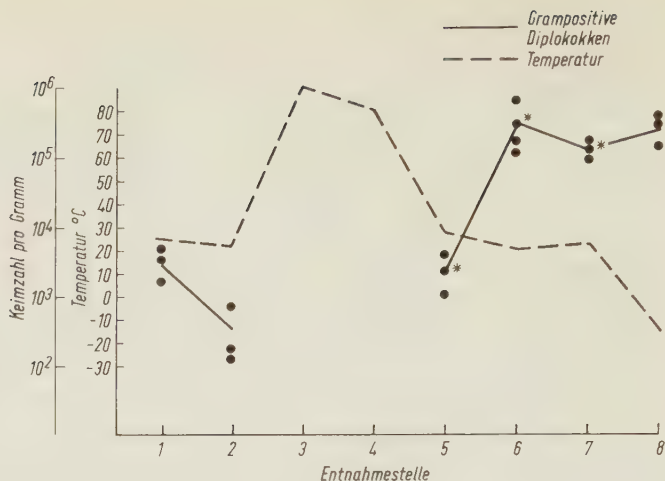
Grampositive Diplokokken und D-Streptokokken

Die Abb. 2 zeigt die Zahl der grampos. Diplokokken an den einzelnen Entnahmestellen, wobei es sich um das arithmetische Mittel aus drei Parallelproben handelt. Jeweils drei Kolonien einer jeden Probe wurden auf ihre Zugehörigkeit zur serologischen Gruppe D und N untersucht.

Der Waschprozeß reduzierte also die Ausgangszahl von 700 grampos. Diplokokken/g Rohgemüse erheblich, und durch das Blanchieren sowie die weitere Hitzeeinwirkung an den *Stellen 3 und 4* wurden diese Keime schließlich soweit vernichtet, daß sie auf Na-Azidagar nicht mehr nachzuweisen waren. Bei der Entnahmestelle 5 traten sie aber wieder auf, wobei es sich teilweise um D-Streptokokken handelte. *Diese Keime müssen also dem Gemüsebrei während des Produktionsganges frisch eingeimpft worden sein.* Dafür spricht auch der Anstieg an der folgenden *Stelle 6*, wo die Diplokokkenzahl die des Rohgemüses sogar übertraf.

Trotz tiefer Temperaturen beim Einfrieren (*Stelle 8*) sank die Zahl der grampos. Diplokokken kaum ab. Das Fehlen von D-Streptokokken an dieser Stelle ist wahrscheinlich ein Fehler der geringen Anzahl von Koloniedifferenzierungen (9 pro Entnahmestelle).

Abbildung 2. Zahl der grampositiven Diplokokken bei den einzelnen Entnahmestellen. Bei den hier gefundenen grampositiven Diplokokken handelt es sich z. T. um D-Streptokokken (s. auch Tab. 1).



Coliforme Keime und Fäkalcolitypen

Das Verhalten der Coliformenzahlen während der Stufenkontrolle ähnelt dem der grampos. Diplokokken, d. h. der Waschvorgang bedingt zunächst ein leichtes Absinken der Coliformenzahl, das Blanchieren vernichtet den Rest. *Später treten die Coliformen aber wieder auf, vor allem finden sich jetzt auch Fäkalcolitypen, deren Zahl sogar höher ist als bei dem Rohgemüse.* Die Gesamtcoliformenzahl liegt allerdings — im Gegensatz zu den grampos. Diplokokken — weit niedriger als an der Entnahmestelle 1. Das Einfrieren erzeugt eine erneute Reduktion, jedoch werden weder die coliformen Keime noch die Fäkalcolitypen vollständig vernichtet, von letzteren überleben 66 %. Der Colititer zeigte ein den Coliformenzahlen *gleichsinniges* Verhalten.

Pathogene Staphylokokken, Salmonellen und Shigellen fanden sich bei keiner Entnahmestelle.

Beurteilung

Bei dem Herstellungsprozeß gibt es drei Maßnahmen, die zu einer Keimreduktion führen: Waschen, Blanchieren und Einfrieren des Gemüses. Durch das Waschen werden nur die in dem das Gemüse umgebenden Schmutz und Tauwasser sitzenden Keime entfernt (Sporenbildner, Coliforme, Diplokokken). Immerhin erfolgt dadurch eine Keimreduktion zwischen 50 und 80 %, was für das folgende Blanchieren nicht unwichtig ist. Sieht man nämlich die Hitzeabtötung als einen monomolekularen Prozeß an, so ist der Effekt bei konstanter Temperatur und Einwirkungszeit von der Ausgangskeimzahl abhängig, d. h. je ungenügender der Waschprozeß und je höher damit die Ausgangskeimzahl, um so größer wird die Zahl der Überlebenden. Bei unseren Untersuchungen erwies sich das Blanchieren als eine sehr wirkungsvolle Maßnahme: Die Gesamtkeimzahl wurde auf weniger als 1 % gesenkt. *Smart u. Brunstetter, Larkin et al., Vaughn u. Stadtman, Pederson*

sowie *Hucker* u. *Robinson* geben dagegen eine Keimzahlreduktion auf 10 % als normal an.

Die oben angeführte Regel für die Hitzeabtötung setzt natürlich eine homogene Bakterienpopulation mit gleicher Hitzeresistenz aller Keime voraus. Da es sich jedoch bei der Flora des gewaschenen Gemüses um eine gemischte Population handelt, muß man für die Wirkung des Blanchierens auch die verschiedene Resistenz der einzelnen Keimarten in Betracht ziehen. So war eigentlich zu erwarten, daß vornehmlich die Sporenbildner die Hitze- einwirkung überstehen würden, doch fanden wir auch noch Staphylo- und Diplokokken.

Das an den Entnahmestellen zwischen Blanchieren und Einfrieren unter Bevorzugung bestimmter Keimarten zu verzeichnende Wiederansteigen der Gesamtkeimzahlen muß auf einer Vermehrung überlebender Keime beruhen, wie die veränderte Zusammensetzung der Mikroflora beweist. Bei der von uns untersuchten Anlage handelte es sich um ein geschlossenes System, d. h. direkte Verschmutzungen scheiden als Reinfektionsquelle aus. Mit großer Wahrscheinlichkeit kommen hierfür aber Bakteriennester in toten Winkeln und Ecken der Anlage in Betracht, wo sich Gemüsebreireste, die nicht im Strom weiterbewegt werden, festgesetzt haben. Von diesen Stellen wird dann der vorüberfließende Gemüsebrei dauernd beimpft.

Splittstoesser et al., *Pederson*, *Hucker et al.* und *Wolford et al.* haben ebenfalls durch Betriebsuntersuchungen gezeigt, daß die endgültige Keimbelastung des fertigen Produktes vorwiegend von dem Ausmaß der Reinfektion nach dem Blanchieren abhängt. Zur Erklärung des z. T. rapiden Ansteigens der Keimzahlen wies *Pederson* darauf hin, daß diese Bakterien sich meist in der Phase des logarithmischen Wachstums und nur selten in der Lag-Phase befinden. Da Mikroorganismen bei Übertragung in ein neues Medium ihre jeweiligen Wachstumsphase beibehalten (*Chesney*), ist es nicht verwunderlich, daß die Keimzahlen trotz geringer Reinfektion schon innerhalb weniger Stunden enorme Werte erreichen.

Von besonderer Bedeutung für die Beurteilung der Handelsware sind die *E.-coli*- und *Enterokokken*-Befunde bei der Stufenkontrolle. Etwa $\frac{1}{4}$ der verschiedenen Gefriergemüse und $\frac{1}{3}$ der Spinatproben enthielten *E. coli* (s. Mitteilung I). Der Anteil dieser „fäkalverunreinigten“ Proben erhöht sich noch, wenn man die enterokokkenpositiven Proben hinzurechnet (32 von 39 Spinatproben!). Zwei Quellen kommen für diese Keime in Betracht: entweder handelt es sich um Mikroorganismen des Rohgemüses, oder es erfolgt während des Produktionsganges eine Reinfektion des durch das Blanchieren keimarm gemachten Produktes. Da das Rohgemüse nach unseren Untersuchungen eine reichhaltige Keimflora aufweist, ist die Frage berechtigt, ob sich vielleicht die letzte Düngung vor der Ernte auf den Keimgehalt des Fertigproduktes auswirkt. *Müller* berichtete z. B., daß man nach einer Berieselung mit nur geringen Mengen mechanisch gereinigten Abwassers *Salmonellen* auf Kartoffeln und den dazugehörigen Bodenproben bis zu 40 Tage, auf Karotten über 10 Tage und auf Kohl bis zu 5 Tage nach der letzten Behandlung nachweisen kann. *Engley* hatte dies schon 1956 für Coliforme und

Fäkalcoli mitgeteilt. Erfolgt also die Ernte innerhalb dieser Fristen, so wird zumindest die Keimflora des Rohgemüses beeinflusst. Allerdings dürfte heute diese Art der Düngung ausscheiden.

Im vorliegenden Falle steht deshalb die Bedeutung der Reinfektion nicht nur für die Erhöhung der Gesamtkeimzahl, sondern auch für das Auftreten von *E. coli* außer Frage. Keinesfalls aber kann es sich hierbei um eine tatsächliche Fäkalverschmutzung gehandelt haben. Wir möchten vielmehr annehmen, daß die „Fäkalkeimzahl“ ab der 5. Entnahmestelle bei der Stufenkontrolle durch Vermehrung einzelner überlebender Keime aus dem Rohgemüse zustande kam. Die Diskussion über den „besseren“ Fäkalindikator, *E. coli* oder Enterokokken, scheint uns wenig sinnvoll. Enterokokken halten sich bei tiefen Temperaturen im Gemüse länger als *E. coli* (Kereluk u. Gunderson, Hartman, Lochhead u. Jones, Jones u. Fabian, Berry, Larkin et al., Hahn u. Appleman, Burton), man kann aber weder mit der einen noch der anderen Keimart das „Eindringen von Fäkalien“, sondern lediglich die „produktionsbedingte Vermehrungsmöglichkeit für Enterobakterien“ nachweisen. Weil nun die hier interessierenden pathogenen Vertreter dieser Gruppe zu den gramneg. Stäbchen gehören, wäre *E. coli* der gegebene Test-Mikroorganismus, zumal sein Nachweis weniger Aufwand erfordert. Die Feststellung, daß sich die Agarkeimzahlen und die *E. coli*- und Diplokokken-Werte bei der Stufenkontrolle gleichsinnig verhielten, legt aber nahe, in der Betriebsüberwachung auf einen zusätzlichen Fäkalindikator-Test zu verzichten. Mit einer „Gesamtkeimzahl“-Bestimmung kann hinreichend gesichert werden, daß die Blanchierung die zu fordernde 99⁰/_oige Keimreduktion bewirkt und daß die Rohrleitungen zwischen Blanchier- und Gefrierapparat ausreichend gereinigt und desinfiziert werden. Über die wünschenswerte, zusätzliche Salmonellenuntersuchung wird in der folgenden Mitteilung berichtet.

Zusammenfassung

In einer Konservefabrik wurde die Herstellung von Gefrierspinat einer Stufenkontrolle unterzogen. Die bakteriologischen Tests erstreckten sich auf Keimzahl und -arten, Coliforme und *E. coli*, Enterokokken, Staphylokokken, Salmonellen und Shigellen. Das Blanchieren (Erhitzen) des gewaschenen Rohgemüses führte zu einer Keimreduktion um 99 %, coliforme Keime waren in 1 g Substanz nicht mehr nachweisbar. Bis zum Gefrieren stiegen die Keimwerte wieder an. Ursache ist die Vermehrung bestimmter Keimarten in stagnierendem Gemüsebrei. Zur Betriebsüberwachung genügt die „Gesamtkeimzahlbestimmung“.

Summary

In a cannery, the preparation of deep-frozen spinach was checked in successive stages. The bacteriological tests concerned the germ numbers and species, coliform germs and *E. coli*, enterococci, staphylococci, salmonellae and shigellae. The heating of the washed raw vegetables reduced the number of germs by 99 per cent; coliform germs could no longer be detected in 1 g substance. The germ numbers increased again prior to freezing. This is due to the generation of various germ species in stagnating vegetable mash. Determining the total germ number is sufficient for inspections of this plant.

Résumé

La fabrication des épinards congelés a été soumise à un contrôle par étapes dans une usine de conserves. Les tests bactériologiques se sont rapportés aux nombre et genre des germes, tels que coliformes et *E. coli*, entérocoques, staphylocoques, salmonellae et bacilles de Shiga. Le blanchiment (échauffement) des légumes crus et lavés a provoqué une réduction des germes de 99 % si bien que dans 1 g de substance aucun germe coliforme n'a pu être mis en évidence. Leur nombre toutefois a de nouveau augmenté jusqu'au point de congélation. Ce phénomène est dû à la multiplication possible de certains genres de germes dans une purée de légumes stagnante. Pour la surveillance de la fabrication, la «détermination du nombre total de germes» est suffisante.

Resumen

En una fábrica de conservas se sometió a un control progresivo la fabricación de espinaca congelada. Los exámenes bacteriológicos tuvieron por objeto la determinación de los números de gérmenes y de las especies, de bacilos coliformes y *E. coli*, enterococos, estafilococos, salmonelas y Shigellas. El calentamiento de la verdura cruda lavada condujo a una reducción de gérmenes del 99 %, no habiéndose comprobado más la existencia de gérmenes coliformes en una sustancia de 1 g. Hasta llegar a la congelación, los números de gérmenes volvieron a aumentar, siendo la causa determinante la multiplicación de determinadas especies de gérmenes que se observa en la masa de verdura que se vuelve espesa. Para el control de servicio es suficiente la «determinación del número total de gérmenes».

Schrifttum

- Berry, J. A.: Ice and Refrig. 84 (1933), 204, zit. n.
H. F. Smart, Food Res. 2 (1937), 515.
Berry, J. A.: Canner 78 (1934), 13.
Berry, J. A.: J. Bact. 51 (1946), 639.
Burton, M. D.: Food Res. 14 (1949), 434.
Chesney, A. M.: J. exp. Med. 24 (1916), 387, zit. n.
C. S. Pederson, Food Res. 12 (1947), 429.
Engley jr., F. B.: Texas Rep. Biol. Med. 14 (1956), 313.
Hahn, S. S. u. M. D. Appleman: Food Technol. 6 (1952), 156.
Hartman, P. A.: Appl. Microbiol. 8 (1950), 114.
Hucker, G. J.: Canner 111 (1950), 12.
Hucker, G. J.: Food Technol. 8 (1954), 79.
Hucker, G. J. u. W. B. Robinson: Canner 111 (1950), 16.
Jones, A. A. u. F. W. Fabian: Techn. Bulletin 229, Agr. Exptl. Station, Michigan State University, 1952.
Larkin, E. P., W. Litsky u. J. D. Fuller: Appl. Microbiol. 3 (1955), 98.
Lochhead, A. G. u. A. H. Jones: Food Res. 1 (1936), 29; 3 (1938), 299; 4 (1939), 203.
Müller, G.: Städtehyg. 8 (1957), 30.
Pederson, C. S.: Food Res. 12 (1947), 429.
Slanetz, L. W.: Mikrobiological quality of foods. New York-London 1963.
Smart, H. F. u. B. C. Brunstetter: Canner 83 (1936), 14.
Smart, H. F. u. B. C. Brunstetter: Food Res. 2 (1937), 151.
Splittstoesser, D. F., G. E. R. Hervey II u. W. P. Wettergreen: J. Milk Food Technol. 28 (1965), 149.
Splittstoesser, D. F., R. Wright u. G. J. Hucker: Appl. Microbiol. 9 (1962), 303.
Thatcher, F. S.: Food Technol. 12 (1958), 117.
Thatcher, F. S.: J. Appl. Bact. 26 (1963), 266.
Vaughn, R. H. u. T. C. Stadtman: Food Freezing 1 (1946), 334, 364, zit. n. G. Borgstrom, Advanc. Food Res. 6 (1955), 163.
Kereluk, K. u. M. F. Gunderson: Appl. Microbiol. 7 (1959), 320.
Wolford, E. R., A. D. King jr. u. H. D. Michener: J. Milk Food Technol. 28 (1965), 183.

III. Mitteilung: Das Verhalten von Salmonellen an Tiefkühlgemüse

Mit 1 Abbildung

Die in Mitteilung I und II beschriebenen Versuche haben gezeigt, daß die teilweise recht hohen Keimzahlen des Tiefkühlgemüses vorzugsweise durch eine *Reinfektion* während der Herstellung zustande kommen. Die Gefahr einer Kontamination mit *pathogenen Keimen* ist dabei zwar gering, aber zumindest in offenen Anlagen nicht auszuschließen. Zur sachlichen Beurteilung einer eventuell daraus resultierenden Gesundheitsgefährdung für den Verbraucher bedarf es auf jeden Fall der Kenntnis des Verhaltens von Krankheitserregern im gefrorenen Produkt. Für Speiseeis sind die Bedingungen weitgehend bekannt (siehe z. B. *Knorr*), doch ist es fraglich, ob die pathogenen Keime im Gefrier-
gemüse den gleichen Gesetzen unterliegen.

Wir ermittelten deshalb die Absterberate von verschiedenen Salmonellenstämmen in diesem Milieu. Der Versuch wurde unter industrieähnlichen Bedingungen durchgeführt, d. h. wir legten Wert auf ein schnelles Einfrieren und eine Lagerung bei mindestens -18°C . Bei langsamem Abkühlen bis ca. -10°C erhält man nämlich eine den praktischen Gegebenheiten nicht entsprechende, *stärkere* Keimreduktion (*Haines, Hucker et al., Berry, Hartsell, Weiser*).

Versuchsmethode

a) Herstellung des Mediums

Wir gingen nach der von *Larkin et al.* und *Smart* empfohlenen Methode vor:

750 g von frischem Freilandspinat wurden kleingeschnitten und mehrmals in Leitungswasser gewaschen, bis aller sichtbarer Schmutz entfernt war. Anschließend verpackten wir den Spinat in ein Mulltuch (Größe $1 \times 0,8\text{ m}$) und hängten dieses Paket 3 min lang in ein 90°C -Wasserbad. Danach wurde das blanchierte Material zum Abkühlen mit sterilem Aqua dest. überspült und in einem sterilen „Starmix“-Apparat 10 min lang homogenisiert. Der pH-Wert des zähflüssigen Spinatbreies betrug 5,8. Eine nachfolgende bakteriologische Untersuchung ergab ausschließlich aerobe Erdsorenbazillen (35/g), die vegetativen Bakterienformen waren also vernichtet.

b) Infektion des Gemüsebreies

Je 10 ml einfacher Nährbouillon wurden mit einer der drei Salmonellenarten, *S. typhimurium*, *S. enteritidis* und *S. paratyphi B* beimpft, deren Antigenstrukturen wir vorher durch Agglutinationsproben mit Faktorensere kontrolliert hatten. Die beimpften Nährlösungen wurden 24 Std. bei 37°C bebrütet, dann in je eine Spinatportion übertragen und diese mit einem sterilen „Ultraturax“ 2 min lang homogenisiert.

Je 2 g des beimpften Mediums füllten wir in ein steriles Röhrchen, verschlossen es mit einem sterilen Korken und stellten es so lange in Eiswasser, bis die gesamte Charge abgefüllt war. Danach wurden alle Röhrchen gemeinsam im Kryostaten innerhalb 8 min auf -18°C eingefroren. Vor dem Einfrieren waren zur Bestimmung des Nullwertes 4 Röhrchen einer jeden Charge beiseitegenommen worden. Am 35. Tag wurden die Proben kurz aufgetaut, wieder eingefroren und weiter bei -34°C gelagert.

c) Bestimmung der Keimzahlen

In verschiedenen Zeitabständen wurden von jeder Charge 4 Röhrchen im Wasserbad (37°C , 5 min) aufgetaut und bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank bei ca. $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Von jeder Untersuchungsprobe stellten wir Verdünnungen bis 1:100 000 her und fertigten damit Endogußplatten an. Nach einer Bebrütungszeit von 24 Std. bei 37°C wurden die Platten ausgezählt und die Keimzahl pro Gramm Untersuchungsmaterial ermittelt. Bei jeder Keimzahlbestimmung wurde durch Agglutinationen die Identität der Keime mit den Inocula kontrolliert.

Ergebnisse

Das Verhalten der Keimzahlen der drei dem Spinat eingepfachten Salmonellatypen während der Lagerung bei Tiefkühltemperatur ist aus Abbildung 1 zu ersehen.

Innerhalb der ersten 24 Std. der Kälteeinwirkung kam es also bei allen drei Chargen zu einer sehr starken Keimzahlreduktion (= Soforttod). Die Werte betrugen nach dieser Zeit im Durchschnitt nur noch 10 % der Ausgangskeimzahlen (S. typhimurium 12 %, S. enteritidis 10 %, S. paratyphi B 8 %). Im weiteren Verlauf der Kältelagerung wurde die Geschwindigkeit des Keimzahlabfalles von Messung zu Messung geringer. Die Keimzahlkurven nehmen einen hyperbolischen Verlauf und nähern sich schließlich asymptotisch der Abszisse der Zeit. Bei S. paratyphi B war schon nach 14 Tagen Lagerung eine Keimzahlreduktion bis unter 1 % des Nullwertes erreicht, bei S. enteritidis erfolgte dies nach 22 Tagen, während die S.-typhimurium-Keimzahl noch am 35. Tag über 2,5 % lag. Eine vollständige Vernichtung der Salmonellen und damit eine Sterilisierung des Spinates ließ sich demnach nicht erreichen!

Um den Einfluß der Temperatur zu prüfen, setzten wir die salmonellenbeimpften Spinatproben vom 35. Lagerungstag ab einer Temp. von -34°C aus, doch ließ sich auch mit dieser Behandlung keine vollständige Keimabtötung erzielen. Es erfolgte zwar bei allen Chargen innerhalb der ersten 24 Std. erneut ein starker Keimzahlabfall, aber selbst nach einer Lagerungszeit von insgesamt 750 Tagen waren in dem Spinat noch lebensfähige Salmonellen aller drei Arten, wenn auch im Verhältnis zum Ausgangswert nur in sehr geringer Zahl, nachweisbar. Im Gegensatz zu der -18°C -Lagerung erwies sich nunmehr die S. enteritidis als widerstandsfähigste Keimart.

Diskussion und Schlußfolgerungen

Die Keimflora von Tiefkühlgemüsen besteht nach Smart in der Hauptsache aus Erdbodenbakterien (soil types). Im allgemeinen haben diese Keime

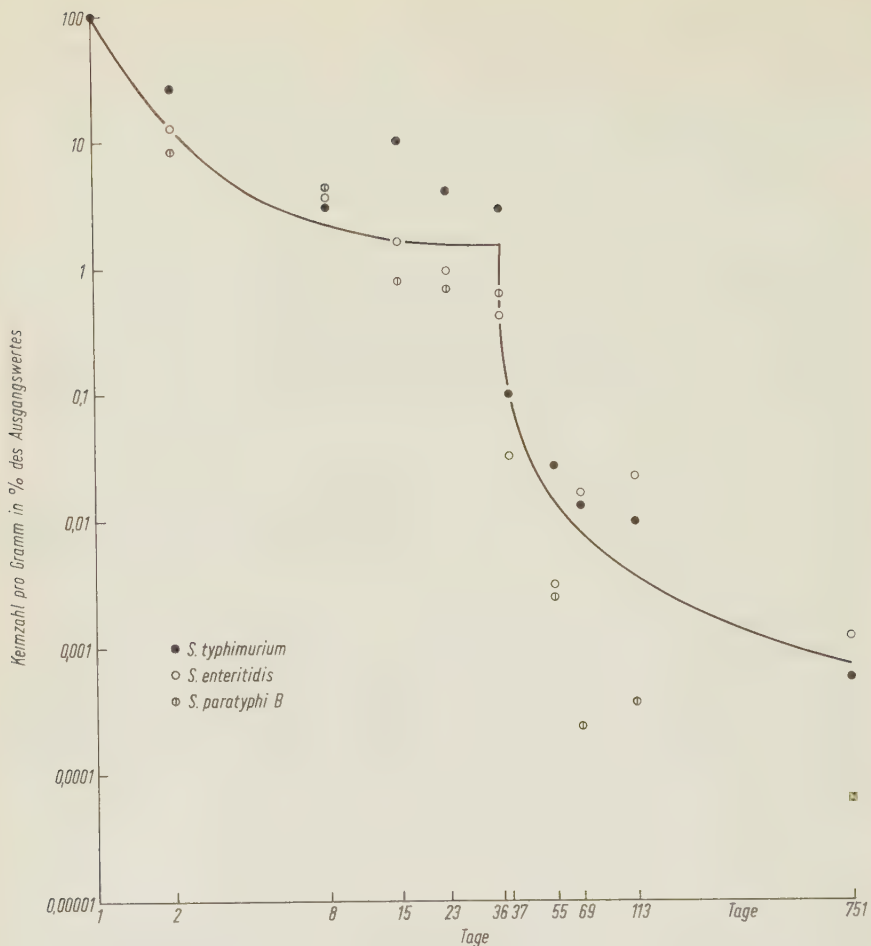


Abbildung 1.

keine gesundheitsschädigenden Eigenschaften; teilweise können sie jedoch Nahrungsmittel verderben, so z. B. wenn Tiefkühlgemüse bei Anwesenheit von *B. perfringens* oder *B. cereus* nach dem Auftauen nicht sofort verbraucht wird. Weitere Berichte über die charakteristischen Keimarten des Tiefkühlgemüses liegen von *Lochhead* u. *Jones*, *Jones* u. *Fabian*, *Hucker*, *Borgstrom* und *Burton* vor, doch fehlt nach unserer Auffassung noch eine zusammenfassende Wertung zur Frage der *hygienischen Beurteilung der Bakterien nach Art und Zahl*.

Zunächst haben die eigenen Untersuchungen und die Auswertung der Literaturberichte gezeigt, daß obligat oder fakultativ pathogene Keime in Tiefkühlgemüsen selbst noch nach sehr langer Lagerungszeit nachweisbar sind. Die Gefahr einer Gesundheitsschädigung ist also existent, zumal sich die im Gemüse vorhandenen Keime nach dem Auftauen wegen des günstigen

Nährbodens innerhalb kurzer Zeit rapid vermehren können (*Lochhead u. Jones; Berry*). Daß bisher noch keine Erkrankungen nachgewiesen wurden, dürfte wohl mit der zumeist eingehaltenen Zubereitungsvorschrift zusammenhängen, wonach das aufgetaute Gemüse für einige Minuten aufgekocht werden soll. Falls es aber nach dem Auftauen roh oder nur angewärmt verzehrt wird, wie das z. B. für Gurken und Kräuter zutrifft, ist eine Infektion immerhin denkbar. Nebenbei sei erwähnt, daß bei Mißachtung der Kochvorschrift durch den Verbraucher der Hersteller gleichwohl für eventuelle Schäden haftet.

Im einzelnen lassen unsere Versuche bei den Absterbekurven der Salmonellen zwei verschiedene Phasen erkennen: Auf eine Schockphase ($+4^{\circ}\text{C}$ auf -18°C bzw. -34°C), in der innerhalb von 24 Stunden die Keimzahlen um 1 bis 3 Zehnerpotenzen gesenkt wurden, folgte eine Dauerlagerungsphase, in der die Geschwindigkeit der Keimverminderung sehr viel geringer ist; selbst durch eine Lagerung über 750 Tage bei Tiefkühltemperaturen wurden die in Spinat eingepfachten Salmonellen nicht vollständig vernichtet. Auch *McCleskey u. Christopher, Hartsell, Wallace u. Park, Schneider u. Gunderson, Cherry et al., Browne, Gunderson u. Rose, Proctor u. Phillips* sowie *Felsenfield u. Young* fanden übereinstimmend, daß durch das Einfrieren zwar die Zahl der Salmonellen vermindert, eine Infektionsgefahr dagegen nie ganz beseitigt werden kann. Erwähnt sei, daß der „Sofort-Tod“ auf rein mechanischer Schädigung der Zellen infolge extrazellulärer Eiskristallbildung beruhen dürfte (*Weiser u. Osterud*), allerdings ist auch noch die Denaturierung des Bakterienproteins als ursächlicher Faktor des Kältetodes in Betracht zu ziehen. Welche Vorgänge hierbei im einzelnen eine Rolle spielen, ist bisher noch nicht geklärt (*van den Broek*). Die Ursachen des „Lagerungstodes“ sind nicht bekannt.

Auffallend sind Unterschiede in der Kälteresistenz der einzelnen Salmonellenarten. Bei unseren Versuchen hatte *S. enteritidis* die größere und *S. typhimurium* sowie *S. paratyphi B* die geringere Widerstandsfähigkeit. Die gleiche Abstufung stellten auch *Gunderson u. Rose, McCleskey u. Christopher* sowie *Doyle* fest. Außerdem berichteten *Aea u. Bushnell* über eine relativ hohe Resistenz von *S. enteritidis* gegenüber physikalischen Einflüssen. Sie beimpften frisches Obstsaftkonzentrat (45–50 % Zucker; pH 2,8–3,2) mit *E. coli*, *S. typhosa*, *Sh. dysenteriae* und *S. enteritidis* und froren es sofort auf -20°C ein. Alle Keimarten waren innerhalb von 1 bis 7 Stunden nicht mehr zu kultivieren, nur *S. enteritidis* konnte noch nach 90tägiger Lagerung nachgewiesen werden. Die Autoren meinten, daß dieses Ergebnis zwar ein Zufallsbefund sein könne, daß aber selbst in einem solchen Falle das Resultat bei der Herstellung von Tiefkühlgemüse berücksichtigt werden müsse.

Von Bedeutung sind in diesem Zusammenhang noch die Feststellungen von *Straka u. Jones, Nakamura u. Dawson*, wonach Bakterien, im besonderen *Sh. sonnei*, durch Kälteeinwirkung in ihrem Stoffwechsel so alteriert werden können, daß sie nach dem Auftauen höhere Ansprüche an die Nährböden stellen. Die Schädigung war um so größer, je länger die Keime einge-

froren waren. Danach besteht die Möglichkeit, daß die im allgemeinen verwendeten Nährböden zum Nachweis nicht optimal waren. Freilich ist dann auch zu bedenken, ob derartig geschädigte Keime für den Menschen noch virulent sind. Zur Beantwortung dieser Frage bedarf es jedoch noch weiterer experimenteller und epidemiologischer Untersuchungen.

Schließlich ist hinsichtlich der eventuell möglichen *Gesundheitsschädigung* noch zu beachten, daß pathogene Staphylokokken durch das Einfrieren keineswegs die Fähigkeit zur Toxinbildung verlieren (Lochhead u. Jones) und daß man durch kurzes Aufkochen ihr *Enterotoxin* nicht vernichten kann.

Allerdings konnten wir im Gegensatz zu *Splitstoesser et al.* sowie *Lochhead u. Jones* bei der Handelsware in keiner Probe *pathogene Staphylokokken* nachweisen (siehe Mitt. I). *Splitstoesser et al.* fanden in 31–64 % aller untersuchten Proben (Erbsen, Bohnen, Mais) koagulasepositive Staphylokokken, wobei die Zahl pro Gramm zwischen 1,4 (Bohnen) bzw. 7,3 (Erbsen) schwankte. Eine Korrelation zwischen hoher Gesamtkeimzahl und dem Auftreten von koagulasepositiven Staphylokokken konnte dabei statistisch nicht gesichert werden. *Lochhead u. Jones* geben noch höhere Zahlen an. Bei ihnen waren z. T. bis 12 % aller Bakterien, die sich in tiefgekühlten Gemüsen nachweisen ließen, *toxinbildende Staphylokokken*. Wahrscheinlich ist das die Folge deren hoher Kälteresistenz, die bei längerer Lagerung das Verhältnis der Keimarten zugunsten der Staphylokokken verschiebt (siehe auch *Hartsell, Proctor u. Phillips, Wundt u. Schittenhelm, McCleskey u. Christopher*). In solchen Fällen ist natürlich die Qualität des Gefriergemüses als „nicht einwandfrei“ zu beurteilen, die Chargen sind einzuziehen und eine sofortige Stufenkontrolle im Betrieb zu veranlassen.

Zur Vermeidung von *Staphylokokkenintoxikationen* haben verschiedene Autoren vorgeschlagen, man solle das Gemüse mit apathogenen, säurebildenden Bakterien beimpfen, die sich nach dem Auftauen sehr schnell vermehren und durch ihre Säurebildung das Gemüse verderben, bevor eventuell vorhandene Staphylokokken mit der Enterotoxinbildung beginnen. Durch den Geruch und Geschmack des verdorbenen Gemüses würde der Verbraucher gewarnt und vom Verzehr abgehalten (*Prescott u. Geer, Wallace u. Park, Berry, Wallace u. Tanner*). Diese Maßnahme erscheint uns mit *Borgstrom* jedoch ein recht zweifelhafter Schutz zu sein. Nach unserer Ansicht muß der Hersteller vielmehr dafür sorgen, daß das Fertigprodukt in jedem Falle die Fabrik einwandfrei verläßt. Bei sorgfältiger Betriebshygiene und ausreichender bakteriologischer Kontrolle ist dieses Ziel auch erreichbar. An erster Stelle steht die Forderung nach einem wirkungsvollen Blanchierungsprozeß, an zweiter die Verhinderung der Reinfektion des Gemüses durch Verkürzung der Zeit zwischen Blanchieren und Einfrieren sowie durch regelmäßige Säuberung und peinlich genaue Desinfektion der Anlage. Sauberkeit und gesundheitliche Überwachung des Personals sollten daneben garantiert sein. Schließlich ist eine einwandfreie Kühlkette vom Hersteller zum Verkäufer zu sichern. (Letzteres ist offenbar noch keine Selbstverständlichkeit, denn wir konnten beobachten, daß in einem Kaufhaus das Gemüse

völlig aufgetaut war und wieder eingefroren wurde!) Für den Verbraucher sind die entsprechenden Auftau- und Kochvorschriften auf den Packungen in jedem Falle deutlich sichtbar anzubringen.

Zur Sicherung der bakteriologisch einwandfreien Beschaffenheit von Tiefkühlgemüse gibt es in Deutschland außer dem Lebensmittelgesetz keine Vorschriften. Immerhin reicht dies aus, um den Hersteller bei nachgewiesener Gesundheitsschädlichkeit seines Erzeugnisses haftbar zu machen. Wir empfehlen deshalb den Gefrierkost-Betrieben, im eigenen oder im Vertragslabor laufend bakteriologische Analysen durchzuführen. Diese sollten sich in erster Linie auf die *Bestimmung der Gesamtkeimzahlen* bei 37° C erstrecken, wobei die Überschreitung der Grenze von 100 000/g sofort eine Kontrolle der Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen auslösen muß. *Auf die Bestimmung der E. coli und der Enterokokken kann verzichtet werden*, da der Aussagewert nicht größer als der der Gesamtkeimzahl ist. Vor allem ist es nicht erlaubt, aus der E.-coli-Zahl auf das Ausmaß einer vermuteten Fäkalverunreinigung zu schließen. Wir empfehlen vielmehr zusätzlich die *direkte Untersuchung auf Staphylokokken und Salmonellen*, weil im Gegensatz zu Wasser, Milch, Speiseeis etc. die Chance besteht, jede Tagesproduktion noch vor der Auslieferung an den Verbraucher auf Unbedenklichkeit zu prüfen. Diese Untersuchung sollte an abgepackten, aber noch nicht eingefrorenen Proben erfolgen. Als Grundlage der Bewertung „einwandfrei“ fordern wir den Nachweis des Fehlens von Salmonellen und pathogenen Staphylokokken in 10 g Material.

Gegen die Einführung von *Grenzwerten* für „Gesamtkeimzahl“ und „Colititer“ zur Beurteilung der aus dem Handel entnommenen Stichproben von Tiefkühlgemüse möchten wir Bedenken anmelden. Zwar sollen sehr hohe Keimzahlen Anlaß zu Betriebskontrollen sein, sie können aber keinesfalls Grundlage einer Beanstandung nach §§ 3 bzw. 4 des LMG darstellen. Hierzu bedarf es des gleichzeitigen Nachweises einer unsachgemäßen, unhygienischen Betriebsführung. Hinweise hierauf erhält man außer durch eine hohe Gesamtkeimzahl auch durch eine Coliformen- bzw. Diplokokkenzahl von mehr als 1000/g, bei breiigen Gemüsen von mehr als 10 000/g. Der Schlüssel zu einem einwandfreien Produkt liegt aber ohne Zweifel in der Produktion, wir möchten uns deshalb der Forderung von *Smart* anschließen: „Go to the source.“

Zusammenfassung

Bei experimenteller Infektion von Spinat (pH 5,8) mit Salmonellen und nachfolgendem Einfrieren kommt es infolge des „Schocktodes“ und des „Lagerungstodes“ zu einer starken Reduktion, aber zu keiner Ausschaltung der pathogenen Keime. Sie waren noch nach 750 Tagen (–34° C) nachweisbar. Aus diesen und den früher beschriebenen Versuchen wird der Schluß gezogen, daß sich die innerbetriebliche, bakteriologische Überwachung von Gefrierkostbetrieben neben der „Gesamtkeimzahl“-Ermittlung auf die Bestimmung von Staphylokokken und Salmonellen erstrecken sollte. Die E.-coli- und Enterokokken-Ermittlung ist entbehrlich. Bei den Handelsprodukten ist eine Untersuchung auf Gesamtkeimzahl, Coliforme und grampositive Diplokokken zu empfehlen. (Grenzwerte 100 000/g bzw. 1000/g. Ausnahme bei Gemüsebreien 10 000 Diplokok-

ken/g.) Eine Überschreitung der Grenzwerte wird aber nicht als strafwürdiger Tatbestand, sondern lediglich als Veranlassung zur Betriebskontrolle betrachtet.

Summary

In experimental infection of spinach (pH 5.8) with salmonellae and subsequent freezing, owing to "shock death" and "storage death" a strong reduction but not an elimination of the pathogenic germs is achieved. They could still be detected after 750 days (-34°C). From these and former tests the conclusion is drawn that the bacteriological examination in deep-freezing plants should also include the examination for staphylococci and salmonellae in addition to the determination of the total germ number. The examination for *E. coli* and enterococci can be dispensed with. The examination of commercial products for total germ numbers, coliform bacteria and gram-positive diplococci is to be recommended. (Permissible values 100,000/g and 1,000/g. Exception with mashed vegetables 10,000 diplococci/g.) Exceeding these maximum permissible values is not considered subject to legal measures but is taken as a reason for plant inspection.

Résumé

Lors d'une infection expérimentale de l'épinard (pH 5,8) par les salmonellae suivie d'une congélation, une forte réduction des germes pathogènes, mais pas leur disparition totale, a été observée par suite d'une «mort par choc» et d'une «mort par stagnation». Les germes pouvaient en effet être encore mis en évidence après 750 jours (-34°C). Il ressort de ces expérimentations et d'autres déjà rapportées que le service de surveillance bactériologique interne à l'usine de fabrication devrait s'efforcer à déterminer, en plus du «nombre total des germes», l'existence des staphylocoques et des salmonellae. La recherche des *E. coli* et des entérocoques n'est pas nécessaire. Dans le cas de produits de consommation, il est recommandé de procéder à la détermination du nombre de germes, des coliformes et des diplocoques à Gram positif. (Valeurs limites 100.000/g et 1.000/g; exception pour les purées de légumes avec 10.000 diplocoques/g.) Un dépassement des valeurs limites ne doit pas être considéré comme passible d'amendes mais doit uniquement inciter à procéder à des contrôles de fabrication.

Resumen

En la infección experimental de la espinaca (pH 5,8) con salmonelas y en la congelación que sigue a continuación, se llega a una reducción considerable a causa de la «muerte por shock» y la «muerte por almacenamiento» en estado de congelación, no lográndose, sin embargo, una eliminación de los gérmenes patógenos. Estos se pudieron comprobar incluso después de 750 días (-34°C). Tomando en consideración estas investigaciones y las descritas anteriormente, se llega a la conclusión de que el control bacteriológico de servicio en los establecimientos o frigoríficos de alimentos congelados, debería extenderse, además de la determinación del «número total de gérmenes», a la determinación de estafilococos y salmonelas, pudiéndose renunciar a la determinación de *E. coli* y enterococos. Para los productos comerciales se recomienda un examen para establecer el número total de gérmenes y la existencia de bacterias coliformes y diplococos grampositivos. (Valores límite 100.000/g y 1.000/g, respectivamente, excepción de purés de verdura 10.000 diplococos/g.) Una transgresión de estos valores máximos no se considera como una circunstancia de delito, sino como una justificación para llevar a cabo un control de fabricación.

Schrifttum

- Aea, R. T. F. u. O. A. Bushnell: Appl. Microbiol. 10 (1962), 277.
- Berry, J. A.: Ice and Refrig. 84 (1933), 204, zit. n. H. F. Smart, Food Res. 2 (1937), 515.
- Berry, J. A.: Canner 78 (1934), 13.
- Berry, J. A.: J. Bact. 51 (1946), 639.
- Borgstrom, G.: Advanc. Food Res. 6 (1955), 163.
- Burton, M. D.: Food Res. 14 (1949), 434.
- Browne, A. S., Ph. D.-Thesis: University of California, Berkeley, 1949, zit. n. G. Borgstrom, Advanc. Food Res. 6 (1955), 163.
- Cherry, W. B.: J. Bact. 51 (1946), 235.
- Doyle, L. P.: J. Infect. Dis. 47 (1930), 92.
- Felsenfeld, O. u. V. M. Young: Poultry Sci. 24 (1945), 353.
- Gunderson, M. F. u. K. D. Rose: Food Res. 13 (1948), 254.
- Haines, R. B.: J. Hyg. 34 (1934), 277.
- Haines, R. B.: Proc. Roy. Soc. 124 (1938), 451.
- Hartsell, S. E.: J. Milk Food Technol. 12 (1949), 107.
- Hartsell, S. E.: Food Res. 16 (1951), 96.
- Hucker, G. J.: Canner 111 (1950), 12.
- Hucker, G. J.: Food Technol. 8 (1954), 79.
- Jones, A. A. u. F. W. Fabian: Techn. Bulletin 229, Agr. Exptl. Station, Michigan State University, 1952.
- Knorr, M.: Arch. Hyg. 136 (1952), 226.
- Larkin, E. P., W. Litsky, J. E. Fuller: Appl. Microbiol. 3 (1955), 98.
- Lochhead, A. G. u. A. H. Jones: Food Res. 1 (1936), 29; 3 (1938), 229; 4 (1939), 203.
- McCleskey, S. S. u. W. N. Christopher: Food Res. 6 (1941), 327.
- Nakamura, M. u. D. A. Dawson: Appl. Microbiol. 10 (1962), 40.
- Prescott, S. C. u. L. P. Geer: Refrig. Eng. 32 (1936), 211, 282, zit. n. G. Borgstrom, Advanc. Food Res. 6 (1955), 163.
- Proctor, B. E. u. A. W. Phillips: Refrig. Eng. 53 (1947), 30.
- Proctor, B. E. u. A. W. Phillips: Amer. J. Publ. Health 38 (1948), 44.
- Smart, H. F.: Phytopathology 24 (1934), 1319.
- Smart, H. F.: Food Res. 2 (1937), 515.
- Schneider, M. D. u. M. F. Gunderson: US Egg a. Poultry Mag. 55 (1949), 10, 22, zit. n. G. Borgstrom, Advanc. Food Res. 6 (1955), 163.
- Splittstoesser, D. F., R. Wright, G. J. Hucker: Appl. Microbiol. 9 (1962), 303.
- Splittstoesser, D. F., G. E. R. Hervey II, W. P. Wettergreen: J. Milk Food Technol. 28 (1965), 149.
- Straka, R. P. u. J. L. Jones: J. Bact. 78 (1959), 181.
- Van den Broek, C. H. J.: I. Chem. Weeksblad 45 (1949), 777; zit. n. G. Borgstrom, Advanc. Food Res. 6 (1955), 163.
- Wallace, G. J. u. S. E. Park: J. Infect. Dis. 52 (1933), 146.
- Wallace, G. J. u. F. W. Tanner: Fruit Prod. J. 13 (1933), 52; zit. n. H. F. Smart, Food Res. 2 (1937), 515.
- Weiser, H. H.: Quick Frozen Foods 13 (1951), 50; zit. n. G. Borgstrom, Food Res. 6 (1955), 163.
- Weiser, R. S. u. C. M. Osterud: J. Bact. 50 (1945), 413.
- Wundt, W. u. P. Schittenhelm: Arch. Hyg. 149 (1965), 567.

Lebenslauf

Ich wurde am 2. Januar 1941 in Leipzig geboren. Von 1947 bis 1951 besuchte ich die Volksschulen in Neustadt/Sachsen und Wackersdorf/Oberpfalz. Ostern 1951 trat ich in das Görres-Gymnasium Koblenz ein und wechselte 1957 auf das Rabanus-Maurus-Gymnasium Mainz über, wo ich 1960 das Abitur ablegte. Das Studium der Medizin begann ich im Sommersemester 1960 an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Hier folgten 1961 die naturwissenschaftliche und 1962 die ärztliche Vorprüfung. Im Sommersemester 1963 studierte ich an der Karl-Franzens-Universität Graz, dann wieder in Mainz bis zum Staatsexamen im Januar 1966.

